

ФАРМАКОЛОГИЯ

М.М. Золотухин

ЭФФЕКТЫ ЭТАНОЛАМИНА, ОДНОКРАТНО ВВОДИМОГО В ТЕМНОВОЙ ФАЗЕ, НА СОДЕРЖАНИЕ ТРИПТОФАНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ГОЛОВНОМ МОЗГЕ КРЫС

Гродненский государственный медицинский университет

Этаноламин (ЭА), спустя 1,5 ч после однократного внутрижелудочного введения крысам в темновой период (100 мг/кг), снижал уровни N-ацетилсе-ротонина в среднем мозге и лобной доле коры больших полушарий. При этом ЭА не изменял содержание триптофана, серотонина и мелатонина в плазме крови. Не отмечалось достоверных изменений в содержании триптофана и его метаболитов гидроксилазного пути обмена в эпифизе. Возможно, обнаруженный эффект связан с вовлечением ЭА в механизмы регуляции активности N- ацетилтрансферазы в мозге крыс.

Этаноламин (2-аминоэтанол, коламин, ЭА, ЕА) является широко распространенным соединением в тканях млекопитающих, где выполняет ряд биологических функций. Основным источником эндогенного ЕА является реакция декарбоксилирования L-серина, он также может поступать в организм с пищей [1]. На особую роль ЕА в ЦНС указывают те факты, что при раздражении ядер моста отмечается выброс этого аминоксписа [2], а также при электрической стимуляции зрительных нервов отмечается увеличение содержания этаноламина в зрительной покрывке в 2,3 раза [3]. Еще одним фактом, поддерживающим это мнение, является то, что ЕА выступает в роли эндогенного ингибитора аминотрансферазы γ -аминомасляной кислоты [4].

Этаноламину приписывают роль модулятора нейрональной активности и выброса ацетилхолина в гиппокампе. При инкубации срезов гиппокампа с ЭА крысы отмечалось увеличение выброса меченого ^3H -ацетилхолина, но не синтеза медиатора [5].

Для этаноламина в мозге млекопитающих была показана способность фосфорилироваться этаноламинкиназой с образованием фосфоэтанолламина (РЕА).

Так как РЕА метаболически связан с глицином [6], выполняющим функции тормозного медиатора [7], возможно, что и часть эффектов ЕА, связанных с изменением содержания нейроактивных аминоксислот, а также соотношения возбуждающих и тормозных медиаторов в ЦНС, опосредуется через фосфорилирование ЕА.

Экзогенный этанолламин может усиливать функциональные эффекты γ - аминомасляной кислоты (GABA) путем ингибирования катаболизма этой аминоксислоты., причем ингибируется ключевой фермент метаболизма GABA – аминотрансфераза, и это приводит к увеличению содержания GABA [4]. Этанолламин при совместном применении с глутаматом или GABA способен усиливать глутаматиндуцированное возбуждение или GABAиндуцированное угнетение нейрональной активности [3]. Для ЭА была показана способность увеличивать содержание дофамина и серотонина, опосредуя, таким образом, по крайней мере частично, свое антиоксидантное действие [8].

Этанолламин является активным положительным мембранотропным агентом, что имеет важное значение в восстановлении и стабилизации биологических мембран при различных патологических процессах и состояниях (например, алкогольная интоксикация, нейродегенеративные изменения, связанные с вовлечением активных форм кислорода).

Таким образом, ЭА в организме реализует свои биологические эффекты в качестве антиоксиданта, адаптогена и нейромодулятора. Эти эффекты могут реализоваться как прямо, так и опосредовано. Циркадианные изменения затрагивают качественные и количественные преобразования в транзиттерных системах головного мозга. Среди таких систем, вовлекаемых в регуляцию физиологических и нейрохимических функций у млекопитающих, претерпевающих циркадианные изменения, одной из основных является серотонинергическая система. Уровни предшественника (триптофана), самого серотонина и его метаболитов изменяются в течение суток.

Анализ литературных данных показывает, что большинство данных, касающихся эффектов этаноламина на транзиттерные системы, были изучены в световую фазу или без учета циркадианного ритма. Работы, посвященные влиянию ЕА на функциональное состояние серотонинергической системы в

скотофазу, отсутствуют. Целью данной работы явилась оценка содержания триптофана, серотонина и его метаболитов при введении этаноламина в ночное время суток, в плазме крови и структурах головного мозга, характеризующихся высокой интенсивностью синтеза и обмена серотонина и в структурах, содержащих большое число проекций серотонинергических нейронов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 12 белых беспородных крыс-самцов массой 150-200 г, которых содержали в течение двух недель при искусственном световом режиме день/ночь (12/12ч). Начало скотофазы приходилось на 21:00 ч, а окончание на 9:00 ч. Внутривенное введение 0,5% раствора этаноламина в дозе 100 мг/кг [6] крысам осуществляли в начале темновой фазы. Контрольная группа получала эквивалентные количества воды. Декапитацию проводили спустя 1,5 часа после внутривенного введения. Отделы головного мозга быстро извлекали и помещали в жидкий азот. Гомогенизацию биологического материала (средний мозг, лобную долю коры) производили тefлоновым пестиком в 10-кратном объеме (эпифизов – в фиксированном объеме 100 мкл) экстракционной среды, содержащей 0,2 М хлорную кислоту, 25 мг/л ЭДТА и 1 мкМ ванилиновую кислоту (VA) (внутренний стандарт). Центрифугировали 15 мин при 13000 g. Супернатанты замораживали и хранили при -78 °С.

Кровь собирали в гепаринизированные пробирки и центрифугировали 15 мин. при 3000 g. К полученной плазме добавляли равные объемы среды для депротеинизации, содержащей 1 М хлорную кислоту, 25 мг/л ЭДТА и 5 мкМ VA. Центрифугирование осуществляли в течение 15 мин при 13000 g. Полученные супернатанты замораживали и хранили при -78°С. Для внутривенного введения использовался этаноламин гидрохлорид (Reanal, Венгрия). Для приготовления подвижных фаз использовали ацетонитрил для ВЭЖХ (НПК «Криохром», Россия), метанол (Merck), KH_2PO_4 , ЭДТА (Reanal, Венгрия), октилсульфонат натрия (Элсико, Россия), ледяную уксусную кислоту хч (НеваРеактив, Рос-

сия). В качестве эталонных соединений применяли L-триптофан (Trp), серотонин креатинин-сульфат (5-НТ) (Reanal, Венгрия), мелатонин (Mel), 5-гидроксиин-долуксусную кислоту (5-HIAA), N-ацетил-серотонин (NAS), ванилиновую кислоту (VA), 5- гидрокситриптофан (5-НТР) (Sigma, США). Воду для подвижных фаз подвергали тройной дистилляции в стеклянном аппарате с последующим удалением следов органических соединений пропусканием через патрон «Norganic» (Millipore, США). Кроме того, для дополнительной очистки буферов их пропускали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Хроматографический анализ проводился методом изократической обращено-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1100 с детектором флуоресценции (G1321A, Германия). Для определения использовали колонку диаметром 3 мм и длиной 250 мм с сорбентом Separon SGX C_{18} , 8 мкм (Элсико, Россия). Разделение проводили при 30°С. Скорость потока элюента 0,5 мл/мин. Введение образцов осуществляли автосамплером (ALS G1313A), объем 20 мкл. Детектирование проводили при длине волны возбуждения 280 нм и испускания 340 нм, соответствующей максимуму интенсивности флуоресценции индольных соединений (проверялось для Trp, 5-НТР, 5-НТ, 5-HIAA, NAS и Mel). Уровни триптофана и его метаболитов определяли, используя подвижную фазу, содержащую 0,1 М дигидрофосфат калия, 17 мМ уксусной кислоты, 25 мг/л ЭДТА, 1 мМ гептилсульфоната натрия, 0,8 мМ октилсульфоната натрия и 11 % метанола (об.). Определение концентраций NAS и Mel проводили по методу, описанному в работе [9]. Интегрирование и расчет содержания триптофана и его метаболитов проводили с помощью программы ChemStation версии A.10.01. Статистическая обработка данных (t-критерий Стьюдента и корреляционный анализ) реализована с помощью программы Statistica 7.0

РЕЗУЛЬТАТЫ

Введение этаноламина в дозе 100 мг/кг в темновой период, спустя 1,5 ч после нагрузки не приводило к изменениям в содержании Trp, 5-НТ и Mel в плазме крови (табл.1).

Таблица 1 - Содержание триптофана (мкмоль/л) и его метаболитов (нмоль/л) в плазме крови крыс через 1,5 ч после введения этаноламина (100 мг/кг) в темновую фазу, среднее \pm s.e.m.

Триптофан и его метаболиты	Контроль	Этаноламин, 100 мг/кг
Trp	83,8 \pm 4,19	92,4 \pm 7,30
5-НТ	1,91 \pm 0,235	1,79 \pm 0,39
Mel	0,028 \pm 0,012	0,0164 \pm 0,0047

В эпифизе также не было отмечено изменений уровней как метаболитов гидроксилазного пути обмена триптофана, так и ацетилазной ветви катаболизма 5-НТ (табл.2). Этанолламин не изменял уровней Трп, 5-НТР, 5-НТ,

5-НИАА, Mel в среднем мозге и в лобной доле коры больших полушарий мозга. Однако, содержание NAS в этих структурах мозга было достоверно снижено (табл. 3, 4).

Таблица 2 - Содержание триптофана и его метаболитов в эпифизе (нмоль/ на эпифиз) крыс через 1,5 ч после введения этаноламина (100 мг/кг) в темновую фазу, среднее \pm s.e.m.

Триптофан и его метаболиты	Контроль	Этанолламин, 100 мг/кг
Трп	0,028 \pm 0,003	0,029 \pm 0,0047
5-НТР	0,0082 \pm 0,0007	0,0079 \pm 0,0009
5-НТ	0,1641 \pm 0,0081	0,2057 \pm 0,0397
5-НИАА	0,005 \pm 0,0012	0,0083 \pm 0,0017
NAS	0,0053 \pm 0,0003	0,0045 \pm 0,00024
Mel	0,0051 \pm 0,00064	0,0044 \pm 0,00078

Таблица 3 - Содержание триптофана и его метаболитов (нмоль/г ткани) в среднем мозге крыс через 1,5 ч после введения этаноламина (100 мг/кг) в темновую фазу, среднее \pm s.e.m.

Триптофан и его метаболиты	Контроль	Этанолламин, 100 мг/кг
Трп	16,02 \pm 1,945	16,44 \pm 1,85
5-НТР	0,19 \pm 0,027	0,23 \pm 0,04
5-НТ	1,39 \pm 0,079	1,54 \pm 0,18
5-НИАА	0,56 \pm 0,113	0,66 \pm 0,11
NAS	0,041 \pm 0,0024	0,029 \pm 0,005*
Mel	0,049 \pm 0,012	0,041 \pm 0,008

Примечание: * $P < 0,05$ при сравнении с контролем

Таблица 4 - Содержание триптофана и его метаболитов (нмоль/г ткани), в лобной доле больших полушарий через 1,5 ч после введения этаноламина (100 мг/кг) в темновую фазу, среднее \pm s.e.m.

Триптофан и его метаболиты	Контроль	Этанолламин, 100 мг/кг
Трп	17,8 \pm 3,02	17,5 \pm 2,58
5-НТР	0,4 \pm 0,093	0,2 \pm 0,03
5-НТ	1,1 \pm 0,203	1,0 \pm 0,11
5-НИАА	0,3 \pm 0,102	0,4 \pm 0,08
NAS	0,06 \pm 0,0046	0,04 \pm 0,004*
Mel	0,02 \pm 0,005	0,02 \pm 0,003

Примечание: * $P < 0,05$ при сравнении с контролем

ОБСУЖДЕНИЕ

В среднем мозге ЕА вызывал достоверное снижение содержание NAS, наряду с исчезновением положительных корреляционных отношений между уровнями Трп и 5-НТ, 5-НИАА с одной стороны и содержанием 5-НТ и 5-НИАА – с другой. Кроме того, отмечалось исчезновение положительных корреляционных связей между содержанием Mel в плазме крови и уровнями Трп, 5-НТР и 5-НИАА в среднем мозге. Изменение уровня NAS и появление отрицательной корреляции между содержанием 5-НТР и NAS ($r = -0,98$) свидетельствовало об угнетении функции N-ацетилтрансферазы.

Подобные изменения наблюдались в лобной доле коры, которая находится в функциональной связи со средним мозгом. Так же, как и в вышеуказанной структуре мозга, в этом отделе отмечалось достоверное снижение уровня NAS. Этанолламин приводил к разрушению корреляционных связей между содержанием Mel в плазме крови и концентрациями Трп, 5-НТ, 5-НИАА и уровнями 5-НТ в плазме и в лобной доле коры. В лобной доле исчезала положительные корреляции в парах 5-НТР, 5-НТ и Трп, 5-НИАА. Исчезновение отрицательной корреляционной связи между уровнями 5-НИАА и NAS, с одной стороны, и достоверное снижение концентрации NAS и появление положительной корреляции между уровнями Mel

и 5-НТТ (r = 1,0), с другой стороны, свидетельствовало о переключении катаболизма 5-НТ с ацетилирования на окислительное дезаминирование, наиболее вероятно, путем ингибирования N-ацетилтрансферазной реакции. Характер этих изменений, возможно, свидетельствует об ослаблении модулирующей функции мелатонина на метаболизм триптофана и серотонина, а также на синаптический выброс последнего в серотонинергических нейронах [10]. Возможно, этот эффект ЕА опосредуется через модуляцию рецепторов мелатонина в среднем мозге и лобной доле коры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Однократное внутривенное введение этаноламина крысам в дозе 100 мг/кг в ночное время не изменяет уровней триптофана, 5-НТ и Mel в плазме крови спустя 1,5 ч после инъекции. В головном мозге отмечается эффект ЕА на мезокортикальную серотонинергическую систему, сопровождающийся угнетением синтеза N-ацетилсеротонина. Возможно, эти влияния опосредуются вмешательством ЕА в регулирующие механизмы синтеза и выброса 5-НТ в среднем мозге и в лобной доле коры больших полушарий.

SUMMARY

M.M. Zolotukhin

EFFECTS OF ETHANOLAMINE UNITARY ENTERED DURING THE DARK PHASE ON CONTENT OF TRYPTOPHAN AND IT METABOLITES IN BLOOD PLASMA AND BRAIN OF RATS

The content of tryptophan and its metabolites in plasma and brain areas of intact rats after 1,5 h of single ethanolamine (2-amino-ethanol, EA) injection in the dark phase. EA was found to decrease the level of N-acetylserotonin (NAS) in the midbrain as well as frontal cortex of rats.

The intragastral injection of EA 100mg/kg caused no change in the levels of tryptophan, serotonin and melatonin in blood plasma as well as tryptophan and metabolites of its hydroxylase pathway in the pineal gland. We suppose the decrease in the content of N-acetylserotonin to be associated with the EA involvement in the regulation of N-acetyltransferase activity in the brain of rats.

ЛИТЕРАТУРА

1. Toxicology of mono-, di-, and triethanolamine / J.B. Knaak [et al.] // Rev. Environ. Contam. Toxicol. – 1997. – Vol.149. – P. 1-86.
2. Release of ethanolamine, but not of serine of choline, rat pontine nuclei on stimulation of afferents from the cortex, in vivo / H. Perschak [et al.] // J. Neurochem. – 1986. – Vol.46, №5. – P.1338-1343.
3. Wolfensberger, M. 2-Aminoethanol as a possible neuromodulator in the pigeon optic tectum / M.Wolfensberger, D. Felix, M. Cuenod // Neurosci. Lett. – 1982. – Vol. 32, №1. – P.53-58.
4. Loscher, W. Effect of aminoethanol on the synthesis, binding, uptake and metabolism of GABA / W. Loscher // Neurosci. Lett. – 1983. – Vol. 42, №3. – P.293-297.
5. Amino alcohol modulation of hippocampal acetylcholine release / J.R. Bostwick [et al.] // Neuroreport. – 1992. – Vol. 3, № 5. – P. 425-428.
6. Островский, Ю.М. Аминокислоты в патогенезе, диагностике и лечении алкоголизма / Ю.М. Островский, С.Ю. Островский. – Мн.: Изд-во «Навука і тэхніка», 1995. – С.164-210.
7. Staatz-Benson, C. Uptake and release of glycine in the guinea pig cochlear nucleus / C. Staatz-Benson, S.J. Potashner // J. Neurochem. – 1987. – Vol. 49, № 1. – P.128-137.
8. Антиоксидантная активность и угнетение перекисного окисления липидов биомембран в механизме действия противоалкогольных соединений. Алкогольная интоксикация и зависимость. Механизмы развития, диагностика, лечение / Г.Н. Смелянская [и др.] – Мн.: Изд-во «Беларусь», 1988. – С.58-69.
9. Золотухин, М.М. Метод определения метаболитов гидроксилазного пути обмена триптофана в эпифизе крысы с помощью ион-парной хроматографии с детектированием по флуоресценции / М.М. Золотухин, Е.М. Дорошенко // Журнал ГрГМУ. – 2007. – № 2. – С.25-28.
10. Simonneaux, V. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by nor-epinephrine, peptides, and other pineal transmitters / V. Simonneaux, C.Ribelayga // Pharmacol. Rev. – 2003. – Vol. 55, № 2. – P.325-395.

Поступила 14.05.2008 г.
